

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Seroprevalencia de Brucella spp. en bovinos del
distrito de Tarma-Junín**

TESIS

para optar el título de Médico Veterinario

AUTOR

Sandra Paola Ventocilla Guerra

Lima - Perú

2006

A mis padres: María y Moisés por todo
su apoyo, cariño y confianza que han
puesto en mí en todos estos años.

A mis hermanos: Claudia y Moisés por
su ayuda y por brindarme un ambiente
alegre hasta la culminación de la tesis.

Y a toda mi familia por sus consejos que
contribuyeron a mi formación como
persona y profesional.

A mi director: Dr. Alfredo Delgado
por su ayuda y paciencia.

A mis asesores: Dra. Rivera y Dr. Evaristo
por toda la ayuda brindada.

Al Dr. Víctor Leyva por su apoyo
al desarrollo de la presente la tesis

Al Ing. Gustavo Timaná y el Ing. José V.
de Pronamachcs por involucrarse en este trabajo

A la Dra. Marlene Cárdenas y el
Dr. Ricardo Rivera del SENASA
por enseñarme y apoyarme en la tesis.

A mis amigos por su contribución
en todo el desarrollo de la tesis.
Y finalmente a todos mis amigos de la
Promoción LXV y LXVI
por los momentos compartidos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN.....	iv
SUMARY.....	v
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 BACTERIOLOGÍA DEL GÉNERO <i>BRUCELLA</i>	3
2.1.1 Taxonomía	3
2.1.2 Etiología de la brucelosis bovina	4
2.1.3 Estructura	4
2.1.4 Características fisiológicas	7
2.2 TRANSMISIÓN	7
2.2.1 Fuentes de infección	8
2.2.2 Vías de infección	9
2.3 PATOGENIA	10
2.3.1 Mecanismo de ingreso y supervivencia intracelular	10
2.3.2 Diseminación e invasión a otros tejidos	12
2.4 MECANISMOS INMUNITARIOS	14
2.5 DIAGNÓSTICO	17
2.5.1 Examen microscópico de frotis	18
2.5.2 Diagnóstico bacteriológico	18
2.5.3 Animales de experimentación	19
2.5.4. Diagnóstico serológico	19
2.5.4.1 Prueba de aglutinación en tubos o prueba lenta.....	20
2.5.4.2 Prueba de aglutinación en placa o prueba rápida	20
2.5.4.3 Prueba del anillo en leche	21
2.5.4.4 Prueba de rosa de bengala	21
2.5.4.5 Prueba de la fijación del complemento (FC)	22
2.5.4.6 Prueba de ELISA indirecta	23
2.5.4.7 Prueba de ELISA competitiva	23
2.5.4.8 Otras pruebas	23

2.6 MEDIDAS DE PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 LUGAR DE ESTUDIO	29
3.2 ANIMALES	30
3.3 MUESTRAS Y CONSERVACIÓN	31
3.4 EQUIPOS Y MATERIALES	31
3.5 REACTIVOS	31
3.6 METODOLOGÍA	31
3.6.1 Prueba de rosa de bengala	31
3.7 ANÁLISIS DE DATOS	32
3.7.1. Tamaño muestral	32
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	40
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	42

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Distribución de la población bovina según sectores y muestreos	
Tarma-Junín, 2004.....	34

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Número de bovinos del distrito de Tarma por edades y sexo, 2004.....30

Figura 2. Población bovina (animales en edad reproductiva) vs animales
muestreados, 2004.....36

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de *Brucella spp.* en bovinos del distrito de Tarma-Junín, mediante la detección de anticuerpos en suero a través de la prueba de Rosa de Bengala. Se procesaron 344 muestras de suero y no se encontraron animales positivos (seroreactores), lo cual indica la ausencia de *Brucella spp.* o una prevalencia menor al 1% en la población estudiada. Estos resultados sugieren un plan estricto de vigilancia epidemiológica y la implementación de un programa de control y erradicación de brucelosis bovina en el distrito de Tarma con el fin de mantener al área “libre” de la enfermedad.

Palabras claves: brucelosis bovina, *Brucella spp.*, seroprevalencia, Rosa de Bengala, anticuerpos.

SUMARY

The objective of this study was to determine the presence of *Brucella spp.* in cattle of the district of Tarma, Junín, through the detection of antibodies in blood using the Rose Bengal test. A total of 344 serum samples were analysed and were not positive animals (seroreactors). This indicated the absence of *Brucella spp.* or a lower prevalence to 1% in the studied population. The results suggest a strict plan of monitoring epidemiologist and also the implementation of an eradication and control program for bovine brucellosis in the district of Tarma with the purpose of maintaining the area “free” of the disease.

Key words: bovine brucellosis, *Brucella spp.*, seroprevalence, Rose Bengal, antibodies.

I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis bovina es una enfermedad infecciosa y de distribución mundial, que posee gran impacto tanto en la salud pública como en la producción pecuaria, constituyendo una barrera hoy más real que potencial, para el comercio e intercambio nacional e internacional de animales y de subproductos de origen animal, lo cual afecta la economía de los países que aún no la han podido erradicar (Aréstegui *et al.*, 2001).

Las estimaciones oficiales sobre las pérdidas anuales por brucelosis bovina en América Latina son de aproximadamente US\$ 600 millones, originadas por la disminución de la producción de carne, leche y de los valores de venta de los animales infectados. (Gil y Samartino, 2000). Se estima que la infección ocasiona una pérdida de 20 a 25% en la producción de leche, por la reducción del período de lactancia debido al aborto y la concepción demorada (Acha y Szyfres, 2003).

Además de la pérdida de producción de leche, hay pérdida de terneros por abortos en estadíos de gestación avanzados, aumento de la mortalidad de neonatos, nacidos débiles, bajo peso al destete y pérdida de reproductores de alto valor genético. Esto es muy importante en los rebaños de carne, donde los terneros representan la única fuente de ingresos (Radostits *et al.*, 2002).

Su impacto sobre la salud pública está asociado por una parte a actividades laborales asociadas con el manejo y manipulación de animales y por otra como enfermedad de transmisión alimentaria por el consumo de leche, quesos frescos y otros derivados lácteos contaminados. La brucelosis causa la fiebre Malta en el ser humano, siendo considerada por los organismos internacionales como la zoonosis más difundida

del mundo (Gil y Samartino, 2000). La importancia de la enfermedad en las personas es una justificación suficiente para su erradicación (Radostits *et al.*, 2002).

Es importante señalar que la Brucelosis es una de las enfermedades incluidas en la lista B de enfermedades de acuerdo a las disposiciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), es decir, se trata de una enfermedad de notificación obligatoria, sin embargo la información epidemiológica sobre brucelosis en las Américas suele ser deficiente, pues frecuentemente está presente sin ser notificada adecuadamente, o bien existen sesgos propiciados por los estudios de diagnóstico (García-Carrillo, C. 1993).

En el Perú existe una gran variedad en la presentación de la enfermedad, dependiendo del área geográfica y tipo de explotación. Los hatos lecheros están, bajo un sistema de crianza intensiva, semi-intensiva y extensiva, con razas de ganado tipo lechero Holstein, Brown Swiss y criollos (SENASA, 2000). Sin embargo, estas explotaciones no tienen un programa sanitario estricto y adecuado, sobre todo en las zonas alejadas de la capital.

La lucha contra la brucelosis se basa en cuatro aspectos fundamentales: el conocimiento de la enfermedad, el diagnóstico correcto, la vacunación y la eliminación de los animales positivos con un único destino: el sacrificio (Samartino, 2003). Las razones para la persistencia de la enfermedad en nuestro país son la poca disponibilidad de laboratorios de diagnóstico, una inadecuada política de vigilancia epidemiológica y la falta de un programa efectivo de control o erradicación de esta enfermedad en el país.

La información sobre la prevalencia de brucelosis en la región andina es escasa, habiéndose reportado en el Valle del Mantaro una prevalencia de 0.28% (Cruz, 1996). Asimismo, los últimos reportes realizados por el SENASA en el año 2003 denotan una prevalencia de 0%, en el departamento de Junín, aunque no se precisa que dentro de este número de animales se encuentren los del distrito de Tarma. Es así que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de la brucelosis bovina en las diversas comunidades del distrito de Tarma.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 BACTERIOLOGÍA DEL GÉNERO *BRUCELLA*

2.1.1 Taxonomía

El análisis del ácido nucleico de 16S del ribosoma (16S rRNA), la composición lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a *Brucella* dentro de la subdivisión α -2 de la Clase *Proteobacteria*. Por tanto, parece que la asociación intracelular con eucariotas es una tendencia evolutiva compartida con otros miembros de la subdivisión α -2. Esto es coherente con ciertas hipótesis sobre la patogenicidad y explica las reacciones cruzadas con otros miembros de esta subdivisión en pruebas serológicas y moleculares (Moriyón *et al.*, 2002).

Hasta hace pocos años se reconocían 6 especies diferentes de *Brucella* (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ovis* y *Brucella canis*) subdivididas en 15 biovariedades que se distinguían entre sí por algunas de sus propiedades bioquímicas y culturales. Así clásicamente se describían *B. melitensis* (3 biovariedades), *B. abortus* (7 biovariedades – ya que se suprimieron los biovares 7 y 8, y el actual biovar 7 corresponde al 9 de la clasificación anterior –), *B. suis* (5 biovariedades), *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* (Orduña *et al.*, 2002).

Sin embargo, los estudios de hibridación del genoma ADN-ADN y de secuenciación de los genes 16S rRNA de *Brucella* han demostrado una homología superior al 95% entre las diferentes especies. Esta homología genética ha llevado a agrupar desde el punto de vista taxonómico a todas las especies de *Brucella* dentro de

una única especie *Brucella melitensis*, y a considerar a cada una de las antiguas especies como biovariedades de la especie *Brucella melitensis* (Orduña *et al*, 2002).

Así, la nomenclatura propuesta para las antiguas especies y biovariedades de *Brucella* sería: *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 1, *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 2, *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 3, *Brucella melitensis* biovar *abortus* 1, etc. A pesar de ello y con objeto de evitar confusiones se mantiene la terminología antigua excepto cuando se trata de nominarlas con fines taxonómicos. (Orduña *et al*, 2002). Recientemente, microorganismos con las características de *Brucella* se han aislado también en varias especies de mamíferos marinos y aunque una nueva especie ha sido propuesta (*Brucella maris*), esta proposición todavía no ha sido aceptada (Blasco, 2002; Samartino, 2003).

2.1.2 Etiología de la Brucelosis Bovina

El patógeno principal en el ganado bovino es la *B. abortus*. El biovar 1 de *B. abortus* es universal y es el predominante de los siete que se presentan en el mundo. También pueden infectarse por *B. suis* y *B. melitensis*, cuando comparten el pastoreo o las instalaciones con cerdos, cabras u ovejas infectados. La infección en bovinos por estas especies de *Brucella* suele ser más transitoria que por *B. abortus*, pero acarrea un grave peligro para la salud pública, ya que las hembras pueden excretar por la leche estas brucelas que son más patógenas para el hombre (Acha y Szyfres, 2003).

2.1.3 Estructura

Los miembros del género *Brucella* son bacterias gram-negativas, intracelulares facultativas (Koneman *et al.*, 1992). Esta bacteria mide 0.5 a 0.7 micras de ancho y 0.6 a 1.5 micras de longitud; no presenta cápsula ni esporas, carecen de flagelos y son inmóviles (Corbel *et al.*, 1984).

La envoltura celular es la estructura más característica, formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplasmático intermedio. La membrana externa de *Brucella* contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS), pero es diferente a la de los

gramnegativos. En primer lugar, es relativamente permeable a agentes hidrófobos como los colorantes, detergentes y sales biliares. En segundo lugar, es resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (Moriyón *et al.*, 2002).

El LPS consta de una parte glucolipídica (lípidos A), inserta en la membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie, y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo, más interno, y la cadena O (Moriyón *et al.*, 2002).

El lípido A de *Brucella* presenta una composición diferente de ácidos grasos a la de las gram-negativas clásicas, a esto se debe el que algunas de las actividades características de los LPS relacionadas con la endotoxigenidad, como la pirogenicidad, sean diferentes en esta bacteria, lo que podría tener significación en la patogénesis (Moriyón *et al.*, 2002).

La cadena “O” está presente en las moléculas LPS de las especies lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*), mientras que las especies rugosas (*B. ovis*, *B. canis*) de forma natural siempre carecen de esta cadena. Esto hace que existan dos tipos diferentes de superficies celulares (Moriyón *et al.*, 2002).

La cadena O (polisacárido O) es capaz de inducir respuestas inmunológicas (anticuerpos) (Schurig, 2000) ya que contiene los epítomos relevantes en el diagnóstico serológico realizado con las pruebas que detectan anticuerpos frente al LPS-S (todas aquellas que emplean suspensiones celulares o extractos que contienen LPS-S). Este polisacárido O está formado sólo por un tipo de azúcar, la N-formilperosamina, sin ramificaciones (Moriyón *et al.*, 2002).

Se presentan tres tipos básicos de epítomos: el A o *abortus*, el M o *melitensis* y el C o común, por lo que *B. abortus* y *B. melitensis* del biotipo 1 serían AC y MC, respectivamente. La generalidad de las Igs producidas en la infección reconocen el epítomo C, por eso en el diagnóstico serológico, es irrelevante el origen (*abortus* o *melitensis*) del antígeno (suspensión celular o LPS-S) y no es posible distinguir el serotipo (AC, MC o AMC) infectante (Moriyón *et al.*, 2002).

Existen varias bacterias gram-negativas que poseen también derivados de la perosamina en su LPS (*Escherichia coli* O:157, *Salmonella* del grupo N [O:30], *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9 y otras). La reacción cruzada con *Y. enterocolitica* O:9 es la más intensa, y la única que hay que tener en cuenta en el diagnóstico en áreas en las que exista tal serotipo (Moriyón *et al.*, 2002).

Además de la cadena O del LPS, las brucela en fase lisa (S) contiene un segundo polisacárido habitualmente llamado hapteno nativo que es químicamente idéntico a la cadena O y contribuiría a dar a la superficie característica de tipo S sin incrementar la densidad de LPS y sus secciones internas (Moriyón *et al.*, 2002).

Las proteínas de la membrana externa se dividen en tres grupos en base a sus pesos moleculares: Grupo 1 (de mayor peso molecular 88-94kda) y posiblemente relacionada con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura. Grupo 2: (de peso 34-40kda) equivalentes a las porinas de otros gram-negativos. Grupo 3: (de peso 25-30kda) su papel es desconocido. Al igual que las del grupo 2, presentan relación antigénica entre cepas de diferentes especies de *Brucella* (Cloeckaert, *et al.*, 2002).

Las proteínas del grupo 2 son muy estudiadas ya que éstas participan primordialmente en la inducción de respuesta inmune. Se sugiere a partir de los resultados preliminares de las reacciones de inmunotransferencia con sueros bovinos positivos a la infección, que las proteínas purificadas son antigénicas y corresponden a componentes diferentes del antígeno inmunodominante LPS (Forero *et al.*, 1991). Existen varias lipoproteínas de bajo peso molecular en la envoltura de *Brucella* y se conocen los genes de tres de ellas y parece ser que inducen una respuesta serológica significativamente menos intensa que el LPS-S (Moriyón *et al.*, 2002).

La composición del periplasma de *Brucella* es casi desconocida, son excepciones una superóxido dismutasa-Cu/Zn, una catalasa y ciertos glucanos circulares de función desconocida (Moriyón *et al.*, 2002). Se sugirió que en el espacio periplasmático podrían estar los precursores de la pared celular, como el hapteno nativo y el polisacárido B (Corbel *et al.*, 1984). Las proteínas citosólicas inducen anticuerpos y también hipersensibilidad retardada a diferencia del LPS que no participa en esta reacción de

hipersensibilidad, pero es muy probable que también lo hagan otras de distinta localización celular (Moriyón *et al.*, 2002).

2.1.4 Características fisiológicas

Todas las especies de *Brucella* son aerobias estrictas, su metabolismo es respiratorio, tienen un sistema citocromo oxidasa basado en el transporte de electrones, con oxígeno o nitrógeno como aceptor terminal y producen nitrato reductasa (García-Carrillo y Lucero, 1993). Las brucelas disponen de un metabolismo oxidativo y no fermentador. *B. abortus* es oxidasa y catalasa positiva, utilizando glucosa, pero preferentemente oxida el eritritol como fuente de energía, responsable de la localización y crecimiento prolífico de manera parcial de la bacteria (Brook *et al.*, 1999).

Todas las especies de *Brucella* tienen una capacidad biosintética reducida. Por esta razón, las brucelas son nutricionalmente exigentes y si bien es posible formular medios definidos (al menos para las especies lisas), crecen más rápido en medios complejos que contengan aminoácidos, bases y vitaminas y otros factores de crecimiento. Todo esto es reflejo, posiblemente, de su adaptación a la vida parasitaria (Moriyón *et al.*, 2002).

A pesar de las necesidades de crecimiento complejas *in vitro*, el organismo puede persistir en determinados productos animales y en el ambiente durante períodos prolongados bajo circunstancias favorables como en la humedad y con temperaturas frías donde puede sobrevivir durante varios meses. Por ejemplo, *B. abortus* es capaz de sobrevivir en estiércol a 12 °C durante 250 días, al igual que en la leche infectada refrigerada y otros productos lácteos sin pasteurizar (William, 1999). Por el contrario, la pasteurización destruye a *B. abortus* en la leche (OPS *et al.*, 1986). También es sensible a los desinfectantes con grupos fenol, halógeno, de amonio cuaternario y aldehído (Radostits *et al.*, 2002).

2.2 TRANSMISIÓN

Dentro del rebaño se puede producir una transmisión tanto horizontal como vertical. La transmisión horizontal suele ser por contaminación directa y, aunque existe

la posibilidad de que la infección se propague por vectores mecánicos (moscas, perros, ratas, garrapatas y otros animales, incluido el hombre); y fomites, ésta no es significativa para las medidas preventivas (Radostits *et al.*, 2002).

Existen pruebas de una transmisión horizontal de la infección de bóvido a perro y de perro a bóvido. La forma más probable y eficaz de transmisión bóvido-a-perro es por exposición a fetos abortados, o a membranas placentarias infectadas, ya que los perros suelen ingerir los restos del parto (Radostits *et al.*, 2002)

2.2.1 Fuentes de infección

La concentración máxima de la bacteria se encuentra en el útero gestante, el feto, las membranas fetales y las descargas vaginales, por lo que todos deben considerarse como fuentes principales de la infección. Sin embargo, el número de bacterias disminuye a lo largo de los cultivos que se realizan en partos secuenciales, y un elevado número de muestras uterinas procedentes de vacas infectadas presenta cultivos negativos tras el segundo y tercer partos (Radostits *et al.*, 2002). La principal fuente de contagio son las secreciones vaginales que se producen desde aproximadamente 15 días antes del aborto o parto hasta 4 semanas siguientes al mismo (Samartino, 2003).

Las vacas infectadas suelen ser portadoras de por vida ya que la placenta puede resultar infectada durante las preñeces subsiguientes y pueden contaminar el ambiente durante el parto (William, 1999). Algunos experimentos demostraron que se pueden eliminar hasta 1×10^{14} brucelas por gramo de placenta (Samartino, 2003). Por esto debemos dar especial atención a la parición normal de animales infectados, pues ellos diseminan cantidades importantes de bacterias que serán difundidas a otros animales que compartan el mismo predio (Gil y Samartino, 2000).

El calostro y la leche también son portadores de brucelas (Samartino, 2003). En menor grado, pueden contribuir a la contaminación del campo las materias fecales de terneros que se alimentan de leche contaminada ya que no todas las brucelas se destruyen en el tracto digestivo (Acha y Szyfres, 2003). Son posibles igualmente las eliminaciones del microorganismo con la orina y la secreción nasal (Nicolet, 1986).

2.2.2 Vías de infección

La forma principal de contagio es por vía digestiva que se produce cuando los animales lamen descargas vaginales, membranas fetales, fetos abortados, terneros recién nacidos y genitales de otros animales, que contienen todos ellos gran número de brucelas. También es importante la ingestión alimentos, agua contaminada y leche de hembras enfermas (Samartino, 2003).

La vía genital puede ser importante sólo si se realiza inseminación artificial con semen infectado ya que se deposita directamente en el útero (pH favorable) de lo contrario, la brucelosis bovina no es una enfermedad venérea. La razón es que la acidez (pH bajo) de la vagina contribuye a destruir las brucelas (Samartino, 2003), aunque en temporada de celo este pH puede ascender ligeramente convirtiéndose en un medio adecuado para la sobrevivencia de la bacteria.

La transmisión es menos frecuente por vía respiratoria mediante la inhalación de polvo y partículas que transportan brucelas que puede tener importancia durante el verano cuando se reúnen los animales en los corrales y mangas para realizar vacunaciones, desparasitaciones, etc. (Samartino, 2003). En forma experimental se ha demostrado que las brucelas pueden penetrar a través de la piel lesionada o aún intacta, pero se desconoce el grado en que interviene esta vía de invasión en la infección natural (Acha y Szyfres, 2003). También puede penetrar a través de la conjuntiva y por vía intramamaria por contaminación de la ubre durante el ordeño (William, 1999).

Un nuevo conocimiento cuya magnitud se evalúa en la actualidad es el de la infección vertical y del fenómeno llamado latencia (Acha y Szyfres, 2003), ésta es una de las vías más sutiles y peligrosas para la transmisión y mantenimiento de la brucelosis animal (Blasco, 2002). Sin embargo, el porcentaje de animales que manifiestan latencia es muy bajo y sólo apreciable en rodeos con ninguna y muy baja prevalencia (Samartino, 2003). Los animales nacidos de madres infectadas pueden contraer la infección latente, antes (*in útero*) y después de nacer (anticuerpos del calostro), sin que produzcan anticuerpos demostrables hasta la gestación (Nicolet, 1986).

Se puede lograr una transferencia de embriones de donantes infectadas sin que se transfiera la infección, y es poco probable que una superovulación reactive la liberación de brucelas en el útero en el momento en que se recogen los embriones. Así, la transferencia de embriones es una técnica segura para salvar el material genético de animales infectados (Radostits *et al.*, 2002).

2.3 PATOGENIA

2.3.1 Mecanismo de ingreso y supervivencia intracelular

Cuando las brucelas invaden los tejidos, son fagocitadas por los polimorfonucleares y macrófagos. Estas bacterias han desarrollado mecanismos para la supervivencia intracelular (Saldarriaga *et al.*, 2002), para lo cual tienen al menos dos componentes que realizan una función inhibitoria para ser destruidos dentro de las células: un lipopolisacárido y un material nucleotídico (Harmon *et al.*, 1989)

Los componentes superficiales de la bacteria son claramente críticos en la primera etapa de la interacción entre el huésped y el parásito. La fagocitosis de la bacteria por parte de los fagocitos no profesionales del hospedero, ocurre como consecuencia del alto grado de afinidad entre las invasinas del microorganismo y los receptores del huésped (Kaufmann, 1995).

El LPS tiene probablemente un papel sustancial en la adherencia y supervivencia intracelular (Adams, 1997). El LPS de *Brucella* en fase lisa presenta en su extremo terminal moléculas de manosa que favorecen la adherencia a los FMN del hospedero a través de los receptores de manosa. Las células de la placenta son ricas en receptores de manosa (Pontow *et al.*, 1992), y este hecho junto al tropismo por el eritritol explica la avidez de *Brucella spp.* por el útero grávido (Aréstegui *et al.*, 2001).

Otros lípidos, como los que contienen ornitina, la presencia de fosfatidilcolina en la membrana externa y los ácidos grasos de cadena larga del lípido A contribuyen a la resistencia contra sustancias bactericida (Aréstegui *et al.*, 2001). Las proteínas externas de membrana exponen una región hidrofílica que es utilizada por la bacteria como mecanismo de entrada a la célula hospedera a través de los receptores de integrina que

se encuentran en las células dendríticas de la piel y mucosas. Las integrinas participan en la interacción intercelular con la matriz extracelular, y están involucradas en la fagocitosis. Este hecho puede explicar la penetración de *Brucella* a través de la piel intacta (Campbell *et al.*, 1994).

Sobre la pared celular, el peptidoglicano está asociado con las proteínas externas de membrana de la bacteria y actúa también como factor de virulencia al interferir con la capacidad bactericida del suero y permitir a la bacteria resistir a los mecanismos de lisis ejercidos por los anticuerpos (Ac) y el complemento (C') (Campbell *et al.*, 1994).

Una vez que la bacteria ha alcanzado el medio intracelular, desarrolla estrategias para su supervivencia como la inhibición de la formación de radicales de oxígeno y nitrógeno, interferencia en la disminución de la disposición del hierro, inhibición de la fusión del fagosoma con el lisosoma, disminución del pH del fagosoma, interferencia con la producción de citocinas como INF γ (interferón gama), IL-12 (interleucina 12) y modificación del tránsito intracelular (Doherty y Kaufmann, 1994).

La fusión del fagolisosoma puede ser inhibida por cepas virulentas de *B. abortus* mediante extractos de superficie (proteínas, azúcares, aminoácidos y carbohidratos) no relacionados con los LPS (Frenchick *et al.*, 1984).

Se ha demostrado que cepas rugosas y lisas de *B. abortus* son rápidamente ingeridas sólo si son opsonizadas con C' o Acs específicos (Harmon *et al.*, 1989). La unión a receptores de C' de partículas cubiertas con fragmentos de componentes C3 del complemento puede proveer al patógeno de una vía segura de entrada y de permanencia en el FMN ya que no dispara la combustión oxidativa y la liberación de metabolitos tóxicos de O₂ (Aréstegui *et al.*, 2001).

La capacidad de evadir a las moléculas tóxicas de oxígeno podría ser importante para su supervivencia intracelular ya que *Brucella* es susceptible a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Además, la supervivencia intracelular de *Brucella* le provee protección contra los mecanismos humorales de defensa (Campbell y Adams, 1992).

Los antígenos solubles participan fundamentalmente en la supervivencia intracelular y en la multiplicación bacteriana. Los nucleótidos cíclicos GMPc y AMPc, liberados por *Brucella*, inhiben la desgranulación de polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) y la liberación de la enzima mieloperoxidasa (MPO) de las células fagocíticas, necesaria para producir reactivos haluros.

La sobrevivencia de esta bacteria dentro de células fagocíticas y no fagocíticas puede ser también aumentada por la expresión de proteínas como la enzima superóxido dismutasa Cu-Zn (SOD) (Tatum *et al.*, 1992) y la proteasa de respuesta a temperaturas aumentadas (HtrA) (Elzer *et al.*, 1996). La producción de estas proteínas de choque térmico ha sido descrita en *B. abortus* y *B. suis* en respuesta al estrés oxidativo, al pH ácido *in vitro* y a otros factores de estrés microambientales; y es esencial para la multiplicación bacteriana (Aréstegui *et al.*, 2001).

En microambientes deficientes en hierro, la bacteria produce sideróforos que son moléculas quelantes del hierro que facilitan su obtención (Leonard *et al.*, 1997). La bacteria además de interferir y evadir con los mecanismos de protección es capaz de utilizar el citoesqueleto para su movilización o su diseminación intracelular (Doherty y Kaufmann, 1994 y Ramírez-Romero, 1998)

2.3.2 Diseminación e invasión a otros tejidos

Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las *Brucellas* son transportadas libres o en el interior de células fagocíticas hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada donde primero se multiplicarán. Estos ganglios linfáticos regionales responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses. Cuando las bacterias no son aisladas y destruidas en los ganglios, se produce su diseminación a través de la vía linfática o más frecuentemente a través de la sangre (Blasco, 2002).

La diseminación septicémica de *B. abortus* es ayudada por la circulación de macrófagos permitiendo así la colonización del bazo, útero, placenta, glándula mamaria, ganglios linfáticos, testículos, epidídimo y glándulas sexuales accesorias en los machos

(William, 1999). Además, estos organismos se pueden localizar en otros órganos y tejidos como hígado, articulaciones (cápsula y bolsa articular), huesos y cartílago, produciendo signos clínicos diversos (Radostits *et al.*, 2002; Jones y Hunt, 1990).

Las brucelas, al igual que la mayoría de las bacterias intracelulares facultativas, producen inflamaciones crónicas de carácter granulomatoso en los órganos que parasitan. Su interacción con los componentes del suero (Ac, C', etc.), neutrófilos, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales da como resultado la producción de una amplia variedad de sustancias capaces de activar los macrófagos, expandir clones de linfocitos T, estimular la hematopoyesis y, en resumen, inducir una reacción inflamatoria (Blasco, 2002).

La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal condiciona que la principal manifestación clínica de la infección sea el aborto durante el último tercio de la gestación (Blasco, 2002). El eritritol, un hidrato de carbono producido por el feto y capaz de estimular el crecimiento y multiplicación de *B. abortus*, se encuentra en concentraciones más elevadas en los líquidos placentarios y fetales, y es el responsable de la localización de la infección en estos tejidos lo que explicaría la gran susceptibilidad de los tejidos fetales del bovino (Acha y Szyfres, 2003).

La infección del útero gestante acaba en una placentitis progresiva que implica al corion, seguida de una endometritis y de la infección de la placenta fetal. La obstaculización del aporte de sangre al feto, los efectos endotóxicos sobre el feto y la infección, son factores que separan o por lo menos alteran las conexiones entre el feto y la madre, y que coadyuvan en la subsiguiente pérdida de viabilidad del feto y dan como resultado el aborto (William, 1999).

La *B. abortus* puede inducir la producción elevada de cortisol que a su vez, deprime la producción de progesterona e incrementa la producción de estrógenos, los cuales inducen a un parto prematuro (Enright *et al.*, 1984). Hay casos en que los fetos llegan a término y nacen terneros muy débiles que mueren a los primeros días de vida imposibilitados de mamar y de seguir a la madre manifestando trastornos digestivos como una gastroenteritis muy intensa (Helman, 1983).

Se describe también una placentitis crónica proliferativa en la cual hay fibrosis difusa acompañada de engrosamiento de los extremos de las vellosidades coriónicas que unen el corion al endometrio. Ello parece ser lo que con frecuencia produce la retención placentaria en las vacas en las que la infección no es suficientemente severa como para provocar aborto (Jones y Hunt, 1990). Las infecciones mixtas suelen ser la causa de la metritis que pueden ser agudas, seguida por septicemia y muerte, o crónicas que provoca esterilidad (Acha y Szyfres, 2003; Radostits *et al.*, 2002).

Después de que una vaca infectada aborta o pare normalmente, el agente patógeno no permanece mucho tiempo en el útero. La infección se vuelve crónica y las brucelas se acantonan en los ganglios y glándulas mamarias de la vaca. Las ubres infectadas no manifiestan signos clínicos pero son una importante fuente de reinfección uterina, una importante fuente de infección para terneros y personas a través de la leche, y son la base de las pruebas de aglutinación en leche y suero lácteo. Las brucelas pueden permanecer en la ubre durante años (García-Carrillo y Lucero, 1993).

En los machos, las principales manifestaciones clínicas son las alteraciones testiculares y la disminución de la fertilidad. Estos toros son potenciales diseminadores de la enfermedad si se emplean para inseminación artificial. (Radostits *et al.*, 2002). También podemos apreciar orquitis, ampulitis, epididimitis y vesiculitis generalmente de tipo crónico; en estos casos, muchos animales dejan de tener participación activa como reproductores por autoeliminación (Helman, 1983).

Con frecuencia se puede aislar *B. abortus* de los tejidos de una sinovitis no supurativa en bóvidos, por lo que se deben considerar sospechosas las inflamaciones higromatosas especialmente de las rodillas (Acha y Szyfres, 2003).

2.4 MECANISMOS INMUNITARIOS

La infección con *Brucella* o la inmunización con vacunas produce dos tipos de respuesta inmunitaria: celular y humoral. Los antígenos principales de *Brucella* son el lipopolisacárido (LPS) que induce anticuerpos aglutinantes (Gómez *et al.*, 1991) y las proteínas de membrana externa, responsables de la inmunidad celular protectora

(Aréstegui *et al.*, 2001). Siendo la *Brucella spp.* un patógeno intracelular, la inmunidad mediada por células desempeña un papel fundamental en la inducción de protección,

El LPS ha demostrado ser el antígeno diferencial entre cepas, pero además es portador de los antígenos inmunodominantes de *Brucella*, por lo que se le considera responsable de la activación de los linfocitos B (LB) y de la inducción de la respuesta inmune humoral (Oñate, 1989); en muchos casos es causante de los signos clínicos de choque séptico por la actividad endotóxica de la *Brucella* (Aréstegui *et al.*, 2001).

Las proteínas, por el contrario, son portadoras de los antígenos responsables de la inmunidad celular, motivo por el cual se considera que las proteínas periplasmáticas y de superficie en *B. abortus* tienen un alto valor como inmunógenos potenciales para su uso en la elaboración de vacunas o como reactivos de diagnóstico que ayuden en la prevención y diagnóstico de la brucelosis bovina (Oñate, 1989).

La inmunidad mediada por células se lleva a cabo mediante la estimulación de linfocitos T (linfocitos T CD4 y CD8) por antígenos externos generalmente de naturaleza proteica (Baldwin, 2002; Forero *et al.*, 1991 y Tizard, 1995).

Los linfocitos T CD4+, más conocidos como linfocitos T helper o colaboradores (Th) se subclasifican en dos, basados en la especificidad de su secreción en respuesta a la estimulación por parte del antígeno patógeno. Los linfocitos Th1 conocidos como células T inflamatorias son capaces de secretar interleucina IL-2, interferón gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- β (TNF- β), y están asociados con la inmunidad de protección a bacterias intracelulares. En contraste los linfocitos Th2 llamados también como células colaboradoras en la respuesta humoral, secretan IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, y son los responsables del control de infecciones por parásitos y de la respuesta a alérgenos (Wyckoff III, 2002).

En el caso de los linfocitos T CD8+, que pueden producir IFN- γ , son células efectoras conocidas como linfocitos citolíticos o citotóxicos (Tc) debido a que por medio de las citoquinas que secretan eliminan los macrófagos infectados con *Brucella spp.* permitiendo que la bacteria sea fagocitada por otras células que puedan destruirla. Además, se considera que éstos linfocitos pueden mediar la destrucción de las células

infectadas por la interacción con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I) asociadas con antígenos brucelares (Baldwin, 2002).

Forestier *et al.* (1999) indica que el CMH-I junto con la IL-1 podrían participar en la presentación de los antígenos brucélicos a los linfocitos T bovinos. Mientras que los linfocitos CD4 (Th1) se relacionan con CHM-II siendo responsables de la eliminación de las brucelas (Aréstegui *et al.*, 2001).

Otras citoquinas proinflamatorias y derivadas de la célula T tienen un papel en el control de la infección. La producción rápida de IL-12 durante la infección con *B. abortus*, es de vital importancia para activar las células Th1 y de esta manera contribuir a la inducción de la resistencia celular adquirida (Zaitseva *et al.*, 1996).

El IFN- γ estimula la actividad antimicrobiana y favorece el procesamiento y presentación antigénica a los linfocitos con el propósito de promover el aumento de la producción de citoquinas que estimulan la inflamación y la producción de óxido nítrico. Adicionalmente, una respuesta Th1 con producción de IFN γ puede promover la secreción de anticuerpos. La producción de IFN- γ por los LT CD4⁺ y CD8⁺ de los bovinos inmunizados contra brucelosis, es el mecanismo de protección más eficiente (Aréstegui *et al.*, 2001).

La IL-10 es una citoquina involucrada en la regulación negativa de la respuesta inmune protectora contra la *B. abortus* mediante la inhibición del patrón Th1 o bloqueando las citoquinas inducidas por la activación del macrófago. Se sugiere que podría estar regulando negativamente la respuesta inflamatoria producida endógenamente y que las células TCD8⁺ pueden inhibir la producción de IL-10 (Fernandes y Baldwin, 1995).

En cuanto a la respuesta humoral, se define que los anticuerpos contribuyen a la protección contra *Brucella spp.*, sin embargo no son lo suficientemente efectivos como la respuesta celular, es por ello que las vacunas vivas son más efectivas frente a las vacunas muertas ya que inducen la respuesta de linfocitos Th2 (Zhan *et al.*, 1995). Los

bovinos infectados con brucelas de fase lisa, presentan en el suero inmunoglobulinas contra los antígenos bacterianos LPS-S, al hapteno natural (NH) y al polisacárido B (Stevens *et al.*, 1994). Varias investigaciones afirman que prácticamente el 95% de la respuesta humoral va dirigida contra LPS liso (Gómez *et al.*, 1991).

La respuesta humoral depende de la producción de inmunoglobulinas de varias clases. Poco después de la infección natural o de la vacunación con cepa 19, las IgM aparecen a los 5 días, alcanzando valores máximos a los 13 días. Las IgG subsiguientes alcanzan su nivel máximo transcurridos de 1 a 2 meses y llegan a ser los principales anticuerpos identificables en las infecciones crónicas. Los anticuerpos IgA se producen normalmente a bajas concentraciones (William, 1999).

Las inmunoglobulinas humorales específicas son transmisibles pasivamente al ternero con el calostro y lo protegen contra la infección. La semivida de los anticuerpos del calostro frente a *B. abortus* en terneros nacidos de vacas vacunadas no infectadas previamente o de vacas infectadas es de 22 días. Es importante definir la naturaleza protectora de la respuesta inmune ya que esto contribuirá a la formación de nuevas vacunas, métodos para evaluación protectora de las vacunas, innovación de tratamientos para animales infectados y personas (Baldwin, 2002).

2.5 DIAGNÓSTICO

Además de las observaciones clínicas, el diagnóstico de la brucelosis animal puede basarse en pruebas de laboratorio directas, mediante el aislamiento bacteriológico, o indirectas, mediante la detección de una respuesta inmune humoral (pruebas serológicas). Sin embargo, debido a la posibilidad de reacciones cruzadas con otras bacterias, la presencia de anticuerpos o la existencia de una respuesta celular en un determinado animal no significan necesariamente que éste sufra una infección activa por *Brucella*. Por ello, los resultados del diagnóstico indirecto deben siempre interpretarse a la luz de los datos clínicos y bacteriológicos (Blasco, 2002).

2.5.1 Examen microscópico de frotis

La brucelosis animal puede diagnosticarse presuntivamente mediante el examen microscópico de frotis de hisopados vaginales, de placenta, de fetos abortados o de semen, coloreados por los procedimientos de Gram, Köster o Stamp y empleando la inmunofluorescencia. Los gérmenes se agrupan en pequeños cúmulos intracelulares como consecuencia de su localización en las células epitelioides. Es necesario confirmar este diagnóstico presuntivo con el aislamiento bacteriológico sobre un medio de cultivo, que es la prueba de diagnóstico más específica (Blasco, 2002).

2.5.2 Diagnóstico bacteriológico

La muestra más recomendable es el hisopado tomado directamente de la vagina de los animales abortados. Además, la leche es una muestra muy recomendable ya que más del 80% de los animales infectados excretan *Brucella* por la leche (Blasco, 2002). También se pueden utilizar los órganos y ganglios linfáticos del feto, envolturas fetales, exudado uterino, calostro, semen y otros órganos afectados (Radostits *et al.*, 2002).

Para cultivarla en medios artificiales requiere en el primo-cultivo una baja tensión de oxígeno, una temperatura de 37°C, un pH entre 6.6-7.4 y luego de varios pasajes se desarrolla bajo condiciones atmosféricas ordinarias (Jones y Hunt, 1990). El cultivo en agar sangre en una atmósfera conteniendo un 10% de CO₂ (salvo para el caso de *B. canis* que no crece en presencia de este gas) es el más simple y utilizado de los procedimientos bacteriológicos. Sin embargo, en veterinaria, se hace indispensable la utilización de medios selectivos, ya que las muestras proceden de lugares normalmente hospedados por una rica flora comensal (vagina, leche, fetos abortados, etc.). Para esto se usa el medio selectivo de Farrell, que contiene suero y una serie de antibióticos a los que dicha especie es resistente (Blasco, 2002).

Las colonias de *Brucella* en aislamiento primario no suelen ser visibles hasta los 3-5 días de incubación (Blasco, 2002). Las *Brucellas* pueden presentarse sobre el cultivo con una morfología de colonia lisa (S) o rugosa (R), algunas con un fenotipo mucóide (Schurig, 2000). Las colonias de cepas S de *Brucella* son relativamente pequeñas, húmedas, transparentes y con una superficie lisa y brillante; las colonias R

son más secas y opacas que las formas S. Es necesario diferenciar unas de otras a fin de obtener los antígenos para las pruebas serológicas. (Nicolet, 1986).

Las pruebas microbiológicas presentan la ventaja de identificar directamente la bacteria y limitar así la posibilidad de resultados positivos falsos pero igualmente necesitan buen equipo de laboratorio y personal bien preparado. Actualmente se está desarrollando una prueba de sonda de ácido nucleico para identificar la bacteria sin radioisótopos, más rápida que los cultivos convencionales y que alcanza los requisitos de sensibilidad para una prueba clínica de uso diagnóstico (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.3 Animales de experimentación

Los animales de experimentación se emplean principalmente cuando el material está muy contaminado (cotiledones). El cobayo es particularmente sensible. Aproximadamente a las tres semanas de la inoculación subcutánea o intraperitoneal se efectúa el examen del suero y el cultivo del bazo e hígado (Corbel, 1991).

2.5.4 Diagnóstico serológico

Las pruebas serológicas constituyen el método de diagnóstico más frecuente. En la actualidad se dispone de un gran número de diferentes pruebas serológicas; todas ellas pueden ser útiles cuando se emplean con criterio. Tanto la reacción de una prueba serológica como su utilidad en cada circunstancia se basan en la sensibilidad que tiene para los anticuerpos de las diferentes clases de inmunoglobulinas y por la concentración sérica del anticuerpo de cada clase (Acha y Szyfres, 2003).

La prueba serológica ideal sería aquella que permitiera un diagnóstico precoz, identificar a los infectados crónicos y diferenciar a los anticuerpos vacunales de los de infección. Además debería ser económica, sencilla y rápida ya que debe realizarse en muchas muestras. No existe prueba serológica alguna que posea todas las cualidades enumeradas (Fensterbank, 1989).

Desde el punto de vista teórico, también debería servir para conocer si una reacción positiva, lo es como consecuencia de la estimulación antigénica por *Brucella* o

por microorganismos que poseen epítomos comunes. Finalmente, esta prueba debería además diferenciar los animales epidemiológicamente peligrosos (excretos activos) de los que no lo son. En estas condiciones, lo más recomendable consistiría en combinar una prueba de barrido o entrada que detectase la mayor proporción posible de animales con anticuerpos frente a *Brucella*, con otra de gran especificidad, que detectase de entre estos últimos sólo los verdaderamente infectados (Blasco, 2002).

Las pruebas mayormente utilizadas en diversos países, incluyendo el nuestro, son: Aglutinación en Placa y Tubo, Rosa de Bengala, Prueba del Anillo, Fijación de Complemento y ELISA indirecto. Las muestras empleadas son suero sanguíneo y leche. Las pruebas ponen en evidencia el nivel de anticuerpos presentes en la enfermedad. Dependiendo del tiempo evolutivo de ésta, los anticuerpos detectables son IgG1, IgG2 e IgM en proporciones diferentes (Nielsen, 2002)

2.5.4.1 Prueba de Aglutinación en Tubos o Prueba Lenta

Precursora de las pruebas serológicas actuales, todavía se sigue empleando en algunos países como prueba base, asociada a una prueba complementaria (Fensterbank, 1989). Esta prueba permite identificar los anticuerpos IgG2 e IgM, aunque es más eficiente en aglutinar los anticuerpos IgM que los IgG (Tizard, 1995).

Es una prueba simple y fácil de estandarizar, en la cual se mide la cantidad total de anticuerpos aglutinantes; la principal desventaja es la dificultad de detectar eficazmente la infección crónica o titulaciones bajas difíciles de interpretar. Este último defecto parece particularmente grave, habida cuenta de cronicidad habitual de la enfermedad, por tal razón la OIE no la recomienda como una prueba diagnóstica (OIE, 2000).

2.5.4.2 Prueba de Aglutinación en Placa o Prueba Rápida

Esta prueba posee una especificidad y sensibilidad igual que la prueba en tubo, se basa en la aglutinación rápida del suero problema frente a la exposición con el antígeno de *Brucella abortus* sobre una placa de vidrio. La prueba identifica IgM, IgG2 e IgG1. Es sencilla y más rápida que la prueba de aglutinación en tubo aunque en ciertas

ocasiones puede encontrarse aglutinación en las diluciones más altas, pero no en las más bajas; esto es el llamado *fenómeno de zona* cuya explicación aún no se conoce (Centro Panamericano de Zoonosis, 1989).

2.5.4.3 Prueba del Anillo en Leche

Es una adaptación de la prueba de aglutinación que utiliza el antígeno teñido con hematoxilina y es capaz de detectar las inmunoglobulinas en la leche, ya sea procedentes de la sangre por filtración (IgM) o bien producidas localmente en la glándula mamaria (IgA). El complejo antígeno-anticuerpo se adhiere a la superficie de los glóbulos grasos y asciende con ellos a la superficie formando un anillo de crema de color púrpura azulado de intensidad variable según el grado de la reacción (Fensterbank, 1989).

Se trata de una prueba muy eficaz, sencilla de realizar y económica. Por su baja sensibilidad puede causar interpretaciones erróneas causadas por condiciones de mastitis, calostro y leche de la etapa final de lactación (Nielsen, 2002). El éxito que se atribuye a esta prueba parece más ligado a la frecuencia de su realización que a su sensibilidad, por lo que tiene aplicación en los programas de investigaciones periódicas en los países libres de brucelosis. En las vacas lecheras, la prueba del anillo en leche es muy utilizada para la vigilancia de la infección con *B. abortus* (William, 1999).

2.5.4.4 Prueba de Rosa de Bengala

La prueba de rosa de bengala consiste en una aglutinación rápida en placa con suero puro y un antígeno coloreado; esta prueba puede utilizar dos tipos de cepas *B. abortus* S99 o S1119.3 teñidas con rosa de bengala con un pH de 3.65. El bajo pH previene algunas aglutinaciones por IgM y favorece la aglutinación por IgG1, de este modo, reduce las reacciones no específicas; esta acidez es el factor responsable de la especificidad de la prueba (Nielsen, 2002).

Las inmunoglobulinas responsables de la reacción son las IgG1 e incluso las IgM, según la forma de preparación del antígeno. Es una prueba cualitativa muy

sensible, económica, sencilla, de fácil ejecución, y rápida que detecta una infección precoz y se puede emplear como prueba de detección inicial (Radostits *et al.*, 2002).

Las reacciones falsas positivas se deben a la actividad residual de anticuerpos de la vacunación, a la presencia de anticuerpos del calostro en terneros, a reacciones cruzadas con ciertas bacterias y a errores de laboratorio; por tales motivos las muestras positivas deben ser confirmadas por otros métodos. Los resultados de falsos negativos podrían atribuirse al tiempo de incubación de la infección, es decir, se procede a la toma de muestra en el animal cuando se encuentra en una incubación temprana de la enfermedad donde los anticuerpos predominantes son los IgM y no los IgG (anticuerpo detectable para la prueba) (Eramus y Davey, 1987).

En regiones de alta prevalencia da resultados muy satisfactorios. Lo mejor es eliminar a todas las vacas positivas para el Rosa de Bengala a pesar de su elevada sensibilidad; y una pequeña proporción de los resultados serán vacas falsas positivas (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.4.5 Prueba de la Fijación del Complemento (FC)

Se utiliza como prueba complementaria en casi todos los países, detecta los anticuerpos de los tipos IgG1 e IgM (aunque la IgM en gran parte es destruida por el calor durante la inactivación del complemento del suero mientras que la IgG2 no fija complemento) (Fensterbank, 1989). La FC es una prueba de gran valor diagnóstico por su alta sensibilidad y especificidad (cerca del 99%); sin embargo, es de uso limitado debido al tiempo que se invierte en su estandarización, su elevado costo, así como su complejidad técnica que requiere de personal calificado (Dájer *et al.*, 2003).

Navarro (1995) determinó un valor de sensibilidad que va de 96% a 98.8% y con respecto a su especificidad estos fluctúan entre 99.4% hasta el 100%. Además, recientes avances en técnicas de laboratorio han permitido una mayor difusión y rapidez de la FC, y actualmente se considera como el método más cercano a una prueba definitiva de infección (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.4.6 Prueba de ELISA Indirecta

La prueba es sencilla, puede detectar anticuerpos tipo IgG1, IgG2 e IgA, principalmente detecta IgG1 en suero bovino. La prueba de ELISA indirecta puede ser usada también en muestras de leche, en donde es altamente sensible, pudiendo detectar anticuerpos en bajas diluciones (López *et al.*, 1998 y Nielsen, 2002).

La sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA indirecta es excelente, pero no puede distinguir entre la respuesta inmunitaria inducida por la vacunación con *B. abortus* cepa 19 y la infección natural con la bacteria (Radostits *et al.*, 2002).

2.5.4.7 Prueba de ELISA Competitiva

Debido a que varias pruebas no son capaces de diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos producidos por la infección se desarrolló la prueba de ELISA competitiva, utilizando como antígeno el LPS-S proveniente de *B. abortus* teniendo una alta sensibilidad y especificidad. De este modo esta prueba es capaz de diferenciar anticuerpos vacunales de los anticuerpos de campo, utilizándose como prueba de confirmación (Dájer *et al.*, 2003).

2.5.4.8 Otras pruebas

Se ha desarrollado la Prueba de Reacción por Cadena de la Polimerasa (PCR) que se podría utilizar tanto en muestras de sangre y leche. Medina *et al.* (2003) demostraron que la prueba PCR con muestras de leche es superior al aislamiento bacteriano y puede ser útil en la confirmación rápida de *Brucella spp.* Se pueden utilizar también pruebas con Bacteriófagos específicos tales como bacteriófagos Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb) y Berkeley (Bk) entre otros (Bricker, 2002 y Leal *et al.*, 1995).

Existen otras pruebas de detección como la Prueba del 2-mercaptoetanol, la de Precipitación del Rivanol, Inmunodifusión Radial con un antígeno polisacárido y la Polarización Fluorescente (Samartino, 2003). El manual estándar de pruebas diagnósticas y vacunas de la OIE reconoce como pruebas bases (tamiz) o “screening test” a las pruebas: Rosa de Bengala, Aglutinación en placa y ELISA indirecta, y

además, las muestras positivas serán confrontadas con una segunda prueba confirmatoria como la prueba fijación de complemento o ELISA competitiva (OIE, 2000).

2.6 MEDIDAS DE PREVENCIÓN, CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS BOVINA

La mayoría de los países con brucelosis han desarrollado programas diseñados para prevenir, controlar y finalmente erradicar la infección del ganado bovino con el objeto de reducir las pérdidas económicas, detener la propagación de la enfermedad y proteger a los ciudadanos de la enfermedad (Radostits *et al.*, 2002). La prevalencia de la enfermedad es un parámetro primordial que debe orientar el método de control escogido (Fensterbank, 1989).

En zonas o países con baja prevalencia y un elevado nivel socioeconómico se puede proceder a un programa de erradicación. Este procedimiento consiste en la detección de los animales infectados mediante pruebas de diagnóstico adecuadas y su inmediata eliminación por sacrificio; y se puede usar sólo o en combinación con la vacunación de terneras. Para el control de la brucelosis bovina en áreas enzoóticas con elevada prevalencia (más del 20% de los rebaños infectados), el uso de vacunas resulta imprescindible, independientemente de su situación socioeconómica. Sin embargo, estos programas de vacunación, por muy eficientemente que se ejecuten, nunca pueden por sí solos lograr la erradicación de la brucelosis (Blasco, 2002). Son muy importantes el control del tránsito de animales y la vigilancia epidemiológica.

En la actualidad se vienen usando dos vacunas principalmente, la cepa 19 y RB51 (ambas de *B. abortus*) para prevenir la brucelosis bovina (Gil y Samartino, 2000). La vacunación no puede erradicar la brucelosis, pero se puede utilizar para sentar las bases de la erradicación. La vacuna *B. abortus* cepa 19 consta de una cepa viva, atenuada y lisa obtenida en los años 30 (Barton, 2000); es la vacuna de elección consagrada por su uso universal, por la protección que confiere durante toda la vida útil del animal y por su bajo costo. La inmunidad (celular) otorgada es relativa y oscila según distintos autores alrededor del 70% (Samartino, 2003).

La vacuna cepa 19 induce un aumento en los títulos de anticuerpos específicamente contra una fracción del LPS (cadena O, propias de las cepas lisas), títulos que persisten post-vacunación y dificultan el diagnóstico (Gómez *et al.*, 1995; Halling, 2002 y Schurig, *et al.*, 2002); ésta es una desventaja importante ya que estas respuestas serológicas no pueden diferenciarse fácilmente de las respuestas inducidas por las cepas de campo de *B. abortus* (Olsen, 2000).

Aristizabal y Céspedes (2000) sostienen que a los 6 meses post vacunación con cepa 19, más del 90% de las terneras no presentan título a IgG. Otras investigaciones sostienen que la respuesta de anticuerpos desaparece entre los 5 y 12 meses post-vacunación en las terneras vacunadas entre los 4 a 8 meses, pero persistirá mayor tiempo si la vacunación sobrepasa los 9 meses de edad (Pluma, *et al.*, 2000). Por tanto la persistencia de los anticuerpos dependerá de la edad, dosis, y la vía de vacunación.

Para obviar su interferencia con el diagnóstico, se recomienda limitar (por legislación) la vacunación a animales de poca edad (terneras de 3 a 8 meses) que pierden rápidamente los anticuerpos originados por la vacuna. A pesar de esto, las respuestas inmunológicas pueden persistir hasta la edad adulta. Por este motivo se probó otra vía para la utilización de la cepa 19, por vía conjuntival (Olsen, 2000).

La vacunación conjuntival con cepa B19 (una inoculación de 5×10^9) produce inmunidad adecuada en el ganado bovino frente a *B. abortus*, induciendo tan sólo una respuesta serológica débil y transitoria. Este procedimiento confiere también protección en bovino frente a *B. melitensis*. La repetición de esta vacuna entre 3 y 12 meses después de la primera refuerza significativamente la eficacia protectora de la vacuna B19 vía conjuntival, de una forma equivalente e incluso superior a la conferida por la vacunación subcutánea, sin inducir una respuesta serológica persistente (Blasco, 2002).

Desde hace algunos años se procede a la vacunación de adultos a fines de controlar el problema de la recontaminación en los rebaños en vías de saneamiento. En este caso se utiliza una dosis reducida de B19, ya sea por vía subcutánea (Cuba, Estados Unidos, Nueva Zelanda, República Sudafricana, Sri Lanka), o bien por vía conjuntival (Francia, Italia). La vacunación por vía conjuntival debería permitir resultados aún más favorables, ya que permite la revacunación aumentando así el nivel de protección. La

respuesta serológica conferida por la dosis reducida de la vacuna cepa 19, disminuye en intensidad y duración (Fensterbank, 1989).

Zambrano *et al.* (1991) trabajó con dosis reducidas en hatos de vacunos infectados con brucelosis y concluye que la aplicación de una dosis reducida es igualmente efectiva para controlar la enfermedad, a pesar de que no se eliminan los animales reaccionantes.

Aunque la disminución de la dosis de cepa 19 hará disminuir la incidencia de aborto en el ganado gestante, los problemas de diagnóstico asociados con los títulos inducidos por la vacuna han menoscabado el uso de la cepa 19 como una vacuna para ejemplares adultos (Olsen, 2000). La vacunación de las vacas adultas ha sido realizada en algunas zonas donde existe infección masiva pero generalmente se desaconseja y sólo podría ser tenida en cuenta cuando el personal veterinario regulador da por bueno el procedimiento (William, 1999).

Por otra parte, la vacuna B19 puede producir algunos efectos secundarios como: alteraciones testiculares e infecciones persistentes en una proporción importante de los toros vacunados, artritis en las vacunaciones de terneras y puede también localizarse y persistir por largos períodos de tiempo en tejidos linfoides y glándula mamaria con excreción activa en leche en las vacas vacunadas en la edad adulta. Además, la cepa vacunal puede producir abortos al administrarse a animales gestantes; sin embargo, las tasas de aborto son bastante bajas cuando se administra la dosis baja recomendada para adultos (Barton, 2000). Tras una inoculación accidental esta cepa vacunal puede provocar infección en el hombre (Blasco, 2002).

La vacuna RB51 es una mutación natural, estable y viva, obtenida en el laboratorio a partir de *B. abortus* cepa lisa 2308 y modificada para que adquiera suficientes propiedades inmunogénicas y se atenuará su virulencia natural. Está elaborada con una cepa rugosa de *B. abortus*, exenta de la cadena O-lateral propia del lipopolisacárido de las especies de *Brucella* en fase lisa, motivo por el cual se logra proteger con ella a los animales sin interferir con las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de brucelosis (Samartino, 2003). Esta es una ventaja importante sobre la cepa 19.

Los ensayos de vacunación efectuados bajo condiciones de campo en áreas de alta y baja prevalencia de brucelosis indicaron que la inmunidad inducida por la cepa RB51 es más fuerte que la inmunidad inducida por la cepa 19, protegiendo el 100% de los animales vacunados. El ganado adulto vacunado con $1-3 \times 10^9$ organismos de cepa RB51 antes de la reproducción estuvo sólidamente protegido contra la infección y el aborto.

La inmunidad que induce la vacuna RB51 es principalmente de tipo celular y las células que activa son preferentemente las de tipo Th1 con inducción del interferón gamma pero no la interleucina IL-4, incluyendo los linfocitos citotóxicos y algunos niveles de anticuerpos IgG2 pero no IgG1 (Vemulapalli *et al.*, 2000).

De todos modos, se debe tener criterio al aplicar esta vacuna, pues el hecho de aplicarla NO significa erradicación sistemática de la enfermedad. Es recomendable que de utilizarse hacerlo previo al servicio, pues de este modo la vacuna tendrá el suficiente “tiempo” de lograr inducir mayor inmunidad y prevenir el aborto. Es muy importante recordar que vacunar animales serológicamente positivos o aquellos que abortan sea con cepa 19 o cepa RB51 NO tiene ningún sentido, ya que ninguna vacuna modifica el curso de la enfermedad (Samartino, 2003).

La vacuna *B. abortus* RB51 ha probado ser una vacuna efectiva y probablemente más efectiva que la cepa 19 bajo condiciones de campo. Está altamente atenuada, es estable y jamás seroconvierte a los animales, evitando así las innecesarias confusiones diagnósticas y disminuyendo el costo de los programas de erradicación. Los animales vacunados como terneras o como adultos obtienen una protección sólida contra la infección y abortos (Schurig, 2000).

Ya que la vacunación con RB51 no seroconvierte, la revacunación de animales para aumentar la inmunidad del rebaño puede llevarse a cabo en forma segura. Con la finalidad de evitar abortos se recomienda que se aplique la primera vacunación entre los cuatro y doce meses de edad, y revacunar entre doce y dieciséis meses de edad. Finalmente, la infección de personas con la cepa RB51 es extremadamente rara, sugiriendo que la RB51 no es patógena para la mayoría de los seres humanos (Schurig, 2000).

Actualmente se están propulsando el desarrollo de nuevas vacunas que puedan inducir una inmunidad mediada por células (Th1) como es el caso de las llamadas vacunas recombinantes, por ejemplo algunos ensayos han logrado inducir a través de la proteína ribosomal L7/L2 (proteína purificada recombinante producida en *E. coli*), indicando que podría ser un antígeno apropiado para inducir una respuesta de tipo celular (Oliveira y Splitter, 1996).

Las proteínas de la membrana externa (OMP II) y la superóxido dismutasa (SOD Cu/Zn), han mostrado inducir una inmunidad mediada por células en bovinos, lo que hace pensar que estas proteínas podrían ser un inmunógenos promisorios para la obtención en el futuro de vacunas recombinantes. (Montaña *et al.*, 1998). Se han utilizado además varias vacunas recombinantes que incluyan antígenos de *Brucella spp.* tales como GroEl, GroEs entre otros, estos inducen tanto respuesta inmune humoral como celular en ratones (Wyckoff III, 2002).

Se ha descrito la construcción de dos vacunas recombinantes: la primera es RB51SOD/85A, es decir, la cepa RB51 tiene la capacidad de expresar SOD-CuZn y simultáneamente de expresar la proteína 85A (proteína protectora del *Mycobacterium bovis*); y la otra vacuna recombinante es RB51ESAT, cepa RB51 que expresa la proteína ESAT-6, otra proteína protectora del *M. bovis*. Estas vacunas recombinantes son capaces de dar una protección contra *Brucella spp.* como para el *Mycobacterium spp.* simultáneamente en ratones (Vemulapalli *et al.*, 2002).

Aunque se ha evaluado un buen número de preparaciones, la literatura disponible sugiere que, en general, las vacunas compuestas de adyuvantes y membranas, proteínas de membranas externas u otros componentes celulares de *Brucella* no son eficaces (Olsen, 2000).

En el Perú, SENASA viene realizando un programa sanitario de control y erradicación de brucelosis bovina basado en métodos serológicos convencionales tales como la Aglutinación en placa, Rosa de Bengala, Prueba de Anillo en Leche; pruebas confirmatorias como la Prueba de Fijación de Complemento y ELISA; y el sacrificio de animales seroreactores.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE ESTUDIO

El Distrito de Tarma, se localiza en la parte central de la provincia de Tarma, departamento de Junín, Sub Región Alto Andina, Región Andrés Avelino Cáceres. Este distrito limita al norte, con los distritos de La Unión y Acobamba; al sur, con el distrito de Huaricolca y la provincia de Jauja (Pomacancha); al este, con los distritos de Huaricolca y Tapo; y al oeste con la provincia de Yauli (Paccha y La Oroya) (Municipalidad de Tarma, 2004).

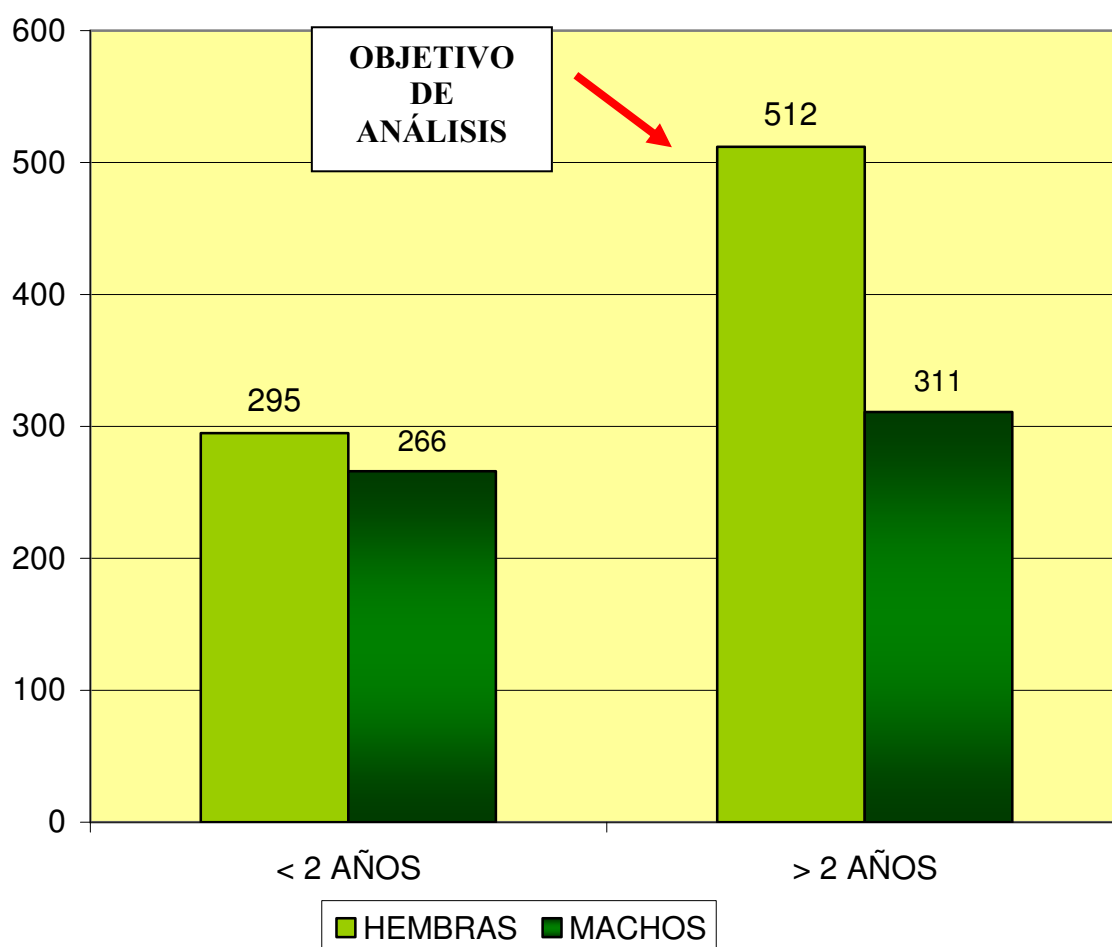
El área tiene una extensión territorial de 459.95 Km² (INEI, 2004) y comprende 40 comunidades campesinas con sus respectivos poblados. El territorio presenta altitudes entre los 3450 a 4462 msnm, con una temperatura promedio anual entre los 5 y 12 °C y con una precipitación pluvial promedio de 300 hasta 800 mm/año.

Aplicando la clasificación de Pulgar Vidal por la altura tenemos en el territorio del distrito de Tarma dos zonas altitudinales: la zona *Quechua* (3000 a 3500 msnm) o Valle de quebrada andenizada que ocupa la mayor parte del territorio, cuyo clima es templado primaveral y posee cultivos intensivos bajo riego; y la zona *Jalca o Suni* (3500 a 4000 msnm) que ocupa las zonas que rodean el valle de Tarma, en la intersección de los macizos cordilleranos cuyo clima es frío con lluvias de octubre a marzo y sequía con heladas intensas de abril a setiembre, aquí se encuentra los pastos naturales y cultivos altoandinos (Rojas y Rojas, 1999).

3.2 ANIMALES

La población bovina del distrito de Tarma es de 1,384 cabezas de ganado bovino, obtenida por los datos de la campaña de vacunación Anti-Aftosa bovina I fase (SENASA, 2001). La mayoría de estos animales están criados bajo un sistema de producción extensiva con pastura natural principalmente. El tipo de ganado, en su mayoría es criollo, pero además en algunas zonas se cría la raza Holstein y en menor cuantía la raza Brown Swiss. Los animales muestreados, objetivos de análisis, son bovinos en edad reproductiva a partir de los 24 meses (edad promedio de madurez sexual en dicho distrito). Estos animales principalmente son de doble propósito es decir para la producción de carne y leche. En cuanto a la vacunación del ganado bovino se realiza contra el carbunclo sintomático (INEI, 2004).

Figura 1: Número de bovinos del distrito de Tarma por edades y sexo, 2004



3.3 MUESTRAS Y CONSERVACIÓN

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción de la vena coccígea, vena yugular o vena mamaria, previa desinfección de la zona y fueron recibidas en el sistema de tubos al vacío (sistema vacutainers de 10ml). Posteriormente, el suero es separado del coágulo; y dentro de las 24 horas de tomadas las muestras es trasvasado en viales y conservado a temperatura de congelación (-20°C) para su posterior procesamiento.

3.4 EQUIPOS Y MATERIALES

- Tubos al vacío x 10 ml (sistema vacutainers)
- Agujas para vacutainers N° 20G x 1"
- Viales 45 x 1.5 – 2.0 ml.
- Tips descartables
- Gradilla x 48 tubos de 16 mm.
- Micropipeta de 5-50µl
- Aglutinoscopio o placa de vidrio
- Espectofotómetro
- Centrifugadora
- Sistema de baño maría
- Refrigeradora y congeladora.

3.5 REACTIVOS

Se utilizó antígeno Rosa de Bengala (cepa *Brucella abortus* 1119-3 al 8%) con un pH de 3.65.

3.6 METODOLOGÍA

Teniendo en cuenta que en el presente trabajo se esperaba encontrar por lo menos un suero reactivo, demostrando que la brucelosis bovina se encuentra presente en la provincia de Tarma, se trabajó la prueba diagnóstica de Rosa de Bengala.

3.6.1 Prueba de Rosa de Bengala

La prueba de Rosa de Bengala está internacionalmente estandarizada para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina y recomendada por el Comité Mixto FAO/OMS de expertos en brucelosis y por la OIE. El antígeno, al unirse con el

anticuerpo presente en los sueros problema produce una reacción de aglutinación visible y uniforme. Un resultado positivo indica la presencia de anticuerpos IgG1 anti – Brucella.

Antes de realizar el diagnóstico de las muestras de suero, deberá realizarse el control del antígeno con los sueros control positivo negativo, con la relación de 30 µl de suero y 30 µl de antígeno.

Procedimiento:

1. Los sueros y antígeno deben estar a una temperatura entre 17-20 °C (temperatura ambiente).
2. Homogenizar el antígeno mediante movimientos rotatorios antes de su uso.
3. Depositar 30 µl (0.03 ml) del suero problema sobre uno de los cuadrados de lámina de vidrio del aglutinoscopio.
4. Colocar 30 µl (0.03 ml) de Antígeno de Rosa de Bengala cerca de la gota de suero problema. No colocar el antígeno encima del suero.
5. Mezclar bien el suero y el antígeno con la ayuda de agitadores o mondadientes (uno por muestra). Formando una zona de 2 centímetros de diámetro aproximadamente (formación del 2x2).
6. Hacer girar la lámina manualmente durante 4 minutos.
7. El resultado de la prueba se lee a los 4 minutos, una reacción positiva, presentará grumos de aglutinación, que pueden ser grandes o pequeños. En cambio en una reacción negativa, no se evidenciará aglutinación. Dado que es una prueba cualitativa, el resultado se registra como positivo o negativo.

3.7 ANÁLISIS DE DATOS

3.7.1 Tamaño muestral

Para la determinación del tamaño muestral se utilizó el método de muestreo aleatorio por sectores de crianza. Para determinar el número de animales mínimo que era necesario muestrear se utilizó la siguiente fórmula para prevalencia límite (Ahlbom y Norell, 1990):

$$n = \frac{\text{Log } (\alpha)}{\text{Log } (1-p)}$$

Donde:

n = número mínimo de muestras

$\alpha = 0.05$ (nivel de precisión al 95%)

p = prevalencia referencial = 0.01 (se tomó en cuenta la prevalencia menor a 1% encontrada por Cruz en 1996 en la cuenca lechera del Valle del Mantaro)

Reemplazando:

$$n = \frac{\text{Log } (0.05)}{\text{Log } (1-0.01)}$$

$$n = 298 \text{ animales}$$

El tamaño de la muestra resultó en 298 animales y éste representa el número mínimo a muestrearse. Para mejorar la cobertura del distrito de Tarma, la población bovina fue estratificada en sectores: este, oeste, norte y sur, utilizando la siguiente fórmula (Ahhom y Norell, 1990):

$$n_h = \frac{N_h}{N} \times n$$

Donde:

n_h = tamaño de muestra del estrato

N_h = población del estrato

N = población total

n = tamaño muestral

Al final se llegó a obtener 344 muestras de suero en todo el distrito. (Cuadro 1)

**Cuadro1: Distribución de la población bovina según sectores y muestreos Tarma-
Junín, 2004**

SECTORES	POBLACION BOVINA	MUESTRAS ESTIMADAS	MUESTRAS TRABAJADAS
ESTE	341	73	86
OESTE	337	73	74
NORTE	320	69	76
SUR	386	83	108
TOTAL	1384	298	344

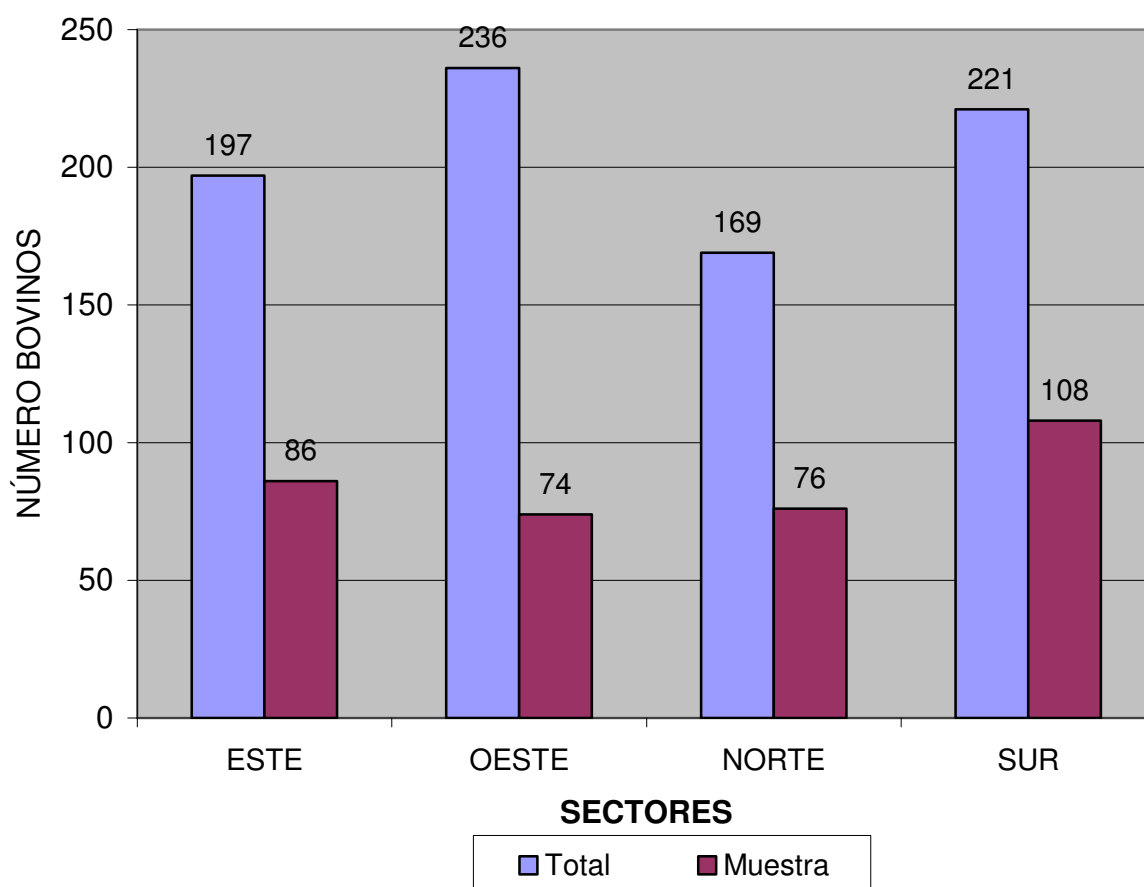
Fuente: Vacunación anti-aftosa bovina I fase (SENASA, 2001)

IV. RESULTADOS

De un total de 40 comunidades, se muestrearon 13. La mayoría de éstas presentaban una crianza extensiva, ya que las vacas vivían al pastoreo las 24 horas del día y eran reunidas únicamente para el ordeño. Las comunidades de Ayas y Misarurasha fueron la excepción, pues contaban con una crianza semi-intensiva e intensiva respectivamente. Las muestras recolectadas pertenecieron a un total de 102 propietarios de los 445 que poseían ganado vacuno en el distrito de Tarma. La mayoría del ganado era manejado en forma individual por los propietarios; excepto el ganado de las comunidades de Ayas y de Urauhoc que compartían pastos naturales y eran manejados en forma colectiva por la comunidad.

El promedio de edad de los vacunos muestreados fue de 2 años; siendo esta, la edad de madurez sexual promedio de las comunidades del distrito de Tarma. Las vacas y vaquillonas muestreadas, objetivo de análisis, fueron criollas a excepción de las provenientes de las comunidades de Ayas y Misarurasha que poseían ganado de razas Brown Swiss y Holstein. Del análisis se puede observar que aproximadamente el 42% de los animales en edad reproductiva fueron muestreados, siendo los resultados por sectores de: 44% al este, 31% al oeste, 45% al norte y 49% al sur.

**Figura 2: Población bovina (animales en edad reproductiva)
vs animales muestreados, 2004**



De los resultados de la prueba diagnóstica, los 344 sueros analizados, procedentes de los cuatro sectores que representa el distrito de Tarma, resultaron negativos a prueba de Rosa de Bengala; por lo que no se determinaron anticuerpos contra *Brucella spp.* Cabe mencionar que adicionalmente se realizó la prueba confirmatoria de Fijación del Complemento a aquellos sueros que provenían de animales con antecedentes de aborto, los cuales resultaron negativos.

V. DISCUSIÓN

Los resultados negativos a anticuerpos contra la *Brucella spp.* obtenidos en el estudio, indican que estos animales no tuvieron experiencia con la *Brucella abortus*, *B. melitensis* o *B. suis*. Esta prevalencia concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en el Valle del Mantaro (Jauja, Concepción y Huancayo), cuya prevalencia fue menor a 1%. En dicho estudio, se utilizó como prueba principal ELISA indirecta detectando una prevalencia de 0.28% (1 positivo); mientras que con las pruebas de Rosa de Bengala y Aglutinación en placa la prevalencia encontrada fue de 0.83% (3 positivos) (Cruz, 1996).

La mayoría de los estudios de prevalencia de brucelosis bovina realizados en el país, se han llevado a cabo en hatos lecheros, muchos de los cuales comercializan la leche hacia las ciudades más cercanas y mayormente se encuentran bajo una crianza intensiva. Esta realidad puede representar un peligro y amenaza para la salud animal y pública, sobretodo por las zonas en donde la leche se destina al autoconsumo y en donde predominan los animales criados al pastoreo. Este es el caso del distrito de Tarma, el cual se ha considerado como zona libre de brucelosis por el SENASA, sin embargo, sólo se tenían datos de la prevalencia de un sólo hato que no representa ni el 1% de la población total de bovinos.

La mayoría de la población bovina muestreada pertenecía a la zona de la Jalca que muestra una actividad ganadera de rebaños pequeños, de tipo criollo, criados en forma extensiva y mixta, sin o con poca tecnología; y que siempre está subordinada a la rentabilidad de la agricultura bajo riego que predomina en el Valle con hortalizas y

flores. La ausencia de la enfermedad puede deberse a que los animales no han tenido experiencia alguna con la bacteria.

Por otra parte, se presentaba otra amenaza que nos llevaba a la sospecha de la presencia de la enfermedad. El distrito de Tarma es el centro de una red de comercialización ganadera regional entre costa (Lima), sierra (Tarma, Oroya, Huancayo y Cerro de Pasco) y selva (La Merced, Satipo, Oxapampa y Tingo María) que abastece con prioridad a la ciudad de Lima pero también a las ciudades de su entorno de sierra y selva. Por otro lado las ferias donde se realizan la compra-venta de bovinos y otras especies constituyen medios favorables para la difusión de enfermedades como la brucelosis. Sin embargo, la ausencia de reactores a *Brucella spp.* en los animales muestreados podría deberse a que esta enfermedad no ha ingresado al distrito.

De encuestas realizadas a los propietarios de los animales, se pudieron rescatar experiencias de campesinos cuyas vacas presentaron antecedentes de aborto (1 vaca) y problemas de preñez (3 vacas), pero estos signos pueden haber sido parte de otros agentes abortivos causales (BVD, *Neospora canis*, *Leptospira hardjo*) o anestro por mal manejo de la cría al pie respectivamente.

La prueba de Rosa de Bengala es altamente sensible y específica, de fácil ejecución, de bajo costo y de mayor eficacia de diagnóstico; posibilitando estrategias de control de *Brucella spp.* en menor tiempo y con la opción de aplicarla en campo. En el Perú, esta prueba se aplica como prueba tamiz y como base en el programa de control y erradicación de brucelosis bovina (Megid *et al.*, 2000); por tanto, es capaz de identificar y seleccionar poblaciones en riesgo en donde no se practique la vacunación contra la brucelosis como es el caso del distrito de Tarma. De haberse encontrado muestras positivas o sospechosas a Rosa de Bengala, se hubiese elegido la prueba de Fijación de Complemento como prueba confirmatoria, pero ante la ausencia de reactores, no se consideró necesaria la inclusión de esta prueba.

El resultado final de esta investigación nos da un valor de prevalencia cero para *Brucella spp.* en los bovinos del distrito de Tarma. Esta prevalencia nos señala que el área podría mantener niveles de infección por debajo del 1% considerando el 95% de confianza en el estudio. La importancia de este resultado para el país, radica en la

posibilidad de tomar ésta y otras áreas con evidencia serológica menores a 1% de *Brucella spp.*, como puntos de partida para aplicar una estricta y sostenida vigilancia epidemiológica; y así mantenerlas libre de la enfermedad. La mayor cobertura de muestras trabajadas comparada con las muestras estimadas, nos permite obtener la prevalencia real de la enfermedad. Todo ello nos obliga a reflexionar sobre la necesidad de acelerar el programa de vigilancia epidemiológica.

Además, considerando los datos obtenidos, le correspondería un programa de erradicación mediante pruebas serológicas de diagnóstico y el sacrificio de los animales que resultaran positivos hasta erradicar completamente los posibles animales reactivos (Acha y Szyfres, 2003); sin embargo, esto podría presentar ciertas dificultades para su procedimiento, debido a la resistencia por parte de los ganaderos de proceder a la eliminación de sus animales positivos. La eliminación de animales infectados puede suponer un problema económico serio para el ganadero, y se deben considerar las posibilidades de pagar compensaciones económicas.

Finalmente, se establecen regiones libres de brucelosis cuando la tasa de infección es lo suficientemente baja, y se restringen los movimientos del ganado entre regiones para evitar la propagación de la infección (Radostits *et al.*, 2002). Ante el gran desconocimiento de la brucelosis bovina en esta zona, así como también ocurre con otras enfermedades de gran importancia zoonótica como es el caso de la tuberculosis bovina; se requerirá educación sanitaria para que el programa de control y erradicación sea eficiente.

VI. CONCLUSIONES

La seroprevalencia de *Brucella spp.* determinada mediante la prueba de Rosa de Bengala en el ganado bovino del distrito de Tarma-Junín es menor al 1%.

Considerando la definición de área libre del SENASA, zona con una prevalencia menor al 1%, el distrito de Tarma se considera una zona libre de brucelosis bovina. Sin embargo, esta condición podría verse amenazada sino se controla el tránsito de animales a la ciudad de Tarma.

VII. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en esta investigación, deberá extenderse el actual programa de control y erradicación de brucelosis bovina, realizado por SENASA, hacia todo el distrito de Tarma. De igual manera que se debería hacer en todos los distritos y provincias del Perú. Dentro del programa se deberá tomar en cuenta a los pequeños productores de bovinos que se encuentran bajo crianza extensiva, y cuyos subproductos se destinan al autoconsumo.

Para poder llegar al éxito esperado en el programa de control y erradicación, se deberá tener un programa de vigilancia epidemiológica y el sacrificio de los animales reactivos, sin inclusión de la vacunación. La aplicación de esta metodología deberá proveer a los servicios nacionales (regionales) de salud animal del monitoreo permanente de esta enfermedad a través de pruebas como Anillo en Leche o la propia Rosa de Bengala.

Finalmente, se recomienda fomentar la educación sanitaria de bioseguridad e implantar un programa previo informativo que sea capaz de concienciar a la población, sobretodo a los campesinos para que le den la verdadera importancia a la erradicación de la Brucelosis Bovina.

VIII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Acha, P.; B. Szyfres. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 3^{ra} ed. Pub. Científica y Técnica N° 580. Organización Panamericana de la Salud, Washington 1: 28-53.
2. Adams G. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses. Emerging Infect. Dis. 1997; 3:1-12.
3. Ahlbom, A; Norell, S. 1990. Introduction to modern epidemiology. 2nd ed. USA: Resources Inc. p 25-27.
4. Aréstegui. M; C. Gualtieri; J. Domínguez; G. Scharovsky. 2001. El género *Brucella* y su interacción con el sistema mononuclear fagocítico. Veterinaria México. 32 (2). 131-139.
5. Aristizábal, M. y Céspedes, N. 2000. Respuesta serológica y persistencia de títulos en terneras Holando Argentino vacunadas y revacunadas con cepa 19 de *Brucella abortus* entre los 3 y 10 meses de edad. Veterinaria Argentina. Vol. XVII. N° 161.
6. Baldwin, C. 2002. Immune response overview. Veterinary Microbiology. Vol. 90. p 365-366
7. Barton, C. 2000. Vacunas antibrucélicas y estrategias de vacunación en diferentes condiciones epidemiológicas y distintos sistemas de producción. En: Reunión de consulta de expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación en los programas de control y erradicación de la brucelosis. Santiago, Chile. p 95-98.

8. Blasco, J. 2002. Brucelosis animal: la enfermedad y medidas para su control y erradicación. En: Manual de brucelosis. Editado por Junta de Castilla y León. España 34: 31-43.
9. Bricker, B. 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Veterinary Microbiology. Vol. 90. 435-446
10. Brook, G.; Butel, J.; Morse, S. 1999. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual moderno. 16^{va} ed. México DF. 306-309.
11. Campbell G; Adams L. 1992. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophage and the use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. Vet Immunol Immunopathol. 34: 291-305.
12. Campbell, G.A.; Adams L.G.; Sowa B.A. 1994. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. Vet Immunol Immunopathol. 41:295-306.
13. Centro Panamericano de Zoonosis (CPZ). 1989. Técnicas e interpretación de las pruebas de sero-aglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina. En: Programa de control y erradicación de tuberculosis, brucelosis y fiebre aftosa. OPS/OMS y IICA. Arequipa-Perú. Nota Técnica N° 2. 1: 1-9.
14. Cloeckaert, A.; Vizcaíno, N.; Paquet, J.; Bowden, R.; Elzer, P. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future. En: Veterinary Microbiology. Vol. 90. p 239-247.
15. Corbel, M.; Brinley-Morgan, W. 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Begey's manual of systematic bacteriology. p 377-388. Ed. Williams y Wilkins. USA.
16. Cruz, J. 1996. Prevalencia de la brucelosis bovina en la cuenca lechera del Valle del Mantaro. Tesis Médico Veterinario. FMV-UNMSM, Lima, Perú. p 28.
17. Dájer, A.; Gutierrez, E.; Zapata, D.; Sierra, E.; Cámara, E. 2003. Evaluación de una prueba de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de competencia (ELISA-C) para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. Revista Biomédica. México. 14(1): 23-28.
18. Doherty, P; Kaufmann, S. 1994. Immunity to infection. Novel insights and new models in a time of rapid technological change. Curr. Opin. Immunol. 6:515-517
19. Elzer, P.H.; Phillips, R.W.; Robertson, G.T.; Roop R.M. 1996. The HtrA response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. Infect Immun. 64(11): 4838-4841.

20. Enright, F.; Walker, J.; Jeffers G.; Deyoe, B. 1984. Cellular and humoral responses of *Brucella abortus*-infected bovine fetuses. Am. J. Vet. Res. 45(3): 424-430
21. Erasmus, J.; Davey, S. 1987. Bovine brucellosis in the highveld region 1. Effect of delay in transit on Rose Bengal test result. En: JI. S. Afr. Vet. Ass. 58(2): 81-84.
22. Fernandes, D.M.; Baldwin, C.L. 1995. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. Infect and Immun. 63(3): 1130-1133.
23. Fensterbank, R. 1989. Brucelosis bovina, ovina y caprina: diagnóstico, control, vacunación. En: Programa de control y erradicación de tuberculosis, brucelosis y fiebre aftosa. OPS/OMS y IICA. Arequipa-Perú. p 1-22.
24. Forero, C.; Rueda, E.; Mariño, O.; Deleon, L. 1991. Purificación y caracterización de proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*. En: Networking in Brucellosis Research. Report of the United Nations University Brucellosis Research Network. p 54-68.
25. Forestier, C.; Moreno, E.; Méresse, S.; Phalipn, A.; Olive, D. Sansonetti, P.; Gorvel, J. 1999. Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B lymphocytes. En: Infection and Immunity. 67(8): 4048-4054.
26. Frenchick, P.; Markham, J.; Cochrane, A. 1984. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by soluble extracts of virulent *Brucella abortus*. Am. J. Vet. Res. 46(2): 333-335.
27. García-Carrillo, C.; Lucero, N. 1993. Enfermedades de los bovinos. Brucelosis bovina. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
28. Gil, A.; Samartino, L. 2000. Brucelosis. En: Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. Livestock Policy Discusión Paper N° 2. Food and Agriculture Organization. p 23-30.
29. Gómez, G.; Moreno, L.; Umaña, G. 1991. Elaboración de vacunas a partir de fracciones antigénicas de *Brucella abortus*. En: Networking in brucellosis research. Report of the United Nations University Brucellosis Research Network. p 33-47.
30. Gómez, P.; Rueda, E.; Gallego, I.; Villamil, M.; Mariño, C. 1995. Mecanismos de protección inducidos por proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepa RB51. Arch. Med. Vet. XXVII, N° extraordinario. p 65-73.

31. Halling, S. 2002. Paradigm shifts in vaccine development: lessons learned about antigenicity, pathogenicity and virulence of *Brucellae*. *Veterinary Microbiology*. USA. Vol. 90. 545-552.
32. Harmon, B.; Adams, L.; Frey, M. 1989. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1092-1097.
33. Helman, M. 1983. *Ganadería tropical*. 3^{ra} ed. p 291-322. Ed. "El Ateneo". Buenos Aires, Argentina.
34. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2004. Censo Nacional Agropecuario de 1994. Disponible en: <http://www.inei.gob.pe/> [28/12/04].
35. Jones, T.; Hunt, R. 1990. *Patología veterinaria*. 5^{ta} ed. Vol II. p 616-619. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
36. Kaufmann S. 1995. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today*. 16:338-342.
37. Koneman *et al.*, 1992. *Diagnostic microbiology*. 4^{ta} ed. Philadelphia. J.B Lippincott Company. (Color Atlas and Textbook of:). p 334-338.
38. Leal, D.; Martínez, I.; López, A. y Martínez, J. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella spp.* From blood and milk of infected animals. En: *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. 33(12): 3087-3090.
39. Leonard, B.; Lopez-Goni, I.; Baldwin, C. 1997. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid protects brucellae from killing by macrophages. *Vet. Res.* 28:87-92.
40. López, J.; Best, A.; Morales, C. 1998. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región). *Arch. Med. Vet.* XXX. Chile 1: 133-138
41. Megid, J., Ribeiro, M.; Marcos, G. 2000. Evaluation of rapid agglutination, tube agglutination, buffered plate antigen and 2-mercaptoethanol tests in the diagnosis of bovine brucellosis. *Brazil. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37(5):107-141.
42. Medina, G.; Rentería, T.; Licea, A.; Navarro, A.; Morales, J.; Montaña, J.; Pujol, L.; Saucedo, J.; Nielsen, K. 2003. Detección de brucelosis en ganado bovino a partir de muestras de leche y colonias sospechosas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). II Simposio internacional de brucelosis. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. p 47-48.

43. Montaña, N.; Rueda, O.; Calderón, C.; Ortega, A.; Puentes, A. 1998. Medición de la respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *B. abortus* RB51 en bovinos. Arch. Med. Vet. 30 (2): 110 - 115.
44. Moriyón, I; Díaz, R.; López, I. 2002. Bacteriología del género *Brucella*. En: Manual de brucelosis. España. 34: 21-30.
45. Municipalidad de Tarma. 2004. Aspectos generales de la provincia de Tarma. Disponible en: <http://www.munitarma.gob.pe/Distritos/Tarma.htm> [28/12/04].
46. Navarro, F. 1995. Determinación de la prevalencia serológica de brucelosis bovina en distintas zonas de la República Argentina. Tesis Bachiller. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río de Cuarto, Argentina.
47. Nicolet, J. 1986. Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. p 82-89. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España.
48. Nielsen, K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. Veterinary Microbiology. USA. Vol. 90. 447-459.
49. Organización Internacional de Epizootias (OIE). 2000. Bovine brucellosis. Manual of standards for diagnostic test and vaccines. París, Francia. p 328-354.
50. Oliveira, S.; Splitter, G. 1996. CD8⁺ type 1 CD44^{hi}CD45Rb^{lo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I and class II deficient mice. Euro J Immunol. 25: 2551-57.
51. Olsen, S. 2000. Vacunas disponibles para el control de brucelosis en animales. En: Reunión de consulta de expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación en los programas de control y erradicación de la brucelosis. Santiago, Chile. p 47-50.
52. Oñate, A. 1989. Proteínas totales de *Brucella abortus* cepa 19 y sus contaminantes. Arch. Med. Vet. 21:103-108.
53. OPS; OMS; BID. 1986. Programa de adiestramiento en salud animal para América Latina. Cuarentena animal. Vol I: Enfermedades cuarentenables. USA 1: 138 – 141.
54. Orduña, A.; Bratos, M.; Abad, R.; Ruiz, L.; De Frutos, M.; Rodríguez, A. 2002. La brucelosis. Etiología y origen de la infección humana. En: Manual de brucelosis. España. No 34: 13-20.

55. Pluma, B.; Alfonso, M.; Mesa, R.; Carrero, R.; Guedes, J. 2000. Obtención y evaluación de la vacuna cubana contra la brucelosis bovina. En Revista Cubana de Ciencias Veterinarias. 26(1):30-32.
56. Pontow, S.; Kery, V.; Stahl, D. 1992. Mannose receptor. Int. Rev. Cytol. 137: 221-241.
57. Radostits, O.; Gay, C.; Blood, D.; Hinchcliff, K. 2002. Medicina veterinaria-tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª ed. Vol I. p 1025-1053. Ed. Mc Graw – Hill Interamericana. Madrid, España.
58. Ramírez-Romero, R. 1998. Is *Brucella abortus* a facultative intracellular pathogen with mitochondria-like activity? Med Hypotheses. 51(1): 41-45.
59. Rojas, T.; Rojas, Y. 1999. Diagnóstico social y agroeconómico. Microcuencas: Muylo-Mullucro. PRONAMACHCS – MIMA. Tarma, Junín. 98 p.
60. Saldarriaga, O.; Ossa, J.; Rugeles, M. 2002. Respuesta inmune y estrategias de evasión durante la infección con *Brucella spp.* Grupo de Inmunovirología - BIOGENESIS, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Rev. Col. Cienc. Pec. 15 (2): 180 – 187.
61. Samartino, L. 2003. Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. 7 p.
62. Sandhu, K.; Joshi, D. 1993. Comparative study in cattle and buffaloes for evaluation of various diagnostic test for brucellosis. Indian J. Pathol. Microbiol. 36(4): 458-465.
63. Schurig, G. 2000. Vacuna *Brucella abortus* RB51. En: Reunión de consulta de expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación en los programas de control y erradicación de la brucelosis. Santiago, Chile. p 57-59.
64. Schurig, G.; Sriranganathan, N.; Corbel, M. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. Veterinary Microbiology. USA. Vol. 90. 479-496.
65. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). 2001. Vacunación anti-aftosa bovina I fase. Lima, Perú. 14 p.
66. Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA). 2003. Programa de control y erradicación de tuberculosis y brucelosis bovina. Lima, Perú. Disponible en: <http://www.senasa.gob.pe> [26/12/04].

67. Stevens, M.; Hennager, S.; Olsen, S.; Cheville, N. 1994. Serologic responses in diagnostic test for brucellosis in cattle vaccinated with *brucella abortus* 19 or RB 51. *Journal of Clinical Microbiology*. 32(4):1065-1066.
68. Tatum, F.; Detilleux, P.; Sacks, J.; Halling, S. 1992. Construction of Cu-Zn superoxide dismutase deletion mutants of *Brucella abortus*: Analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and *in vivo* in mice. *Infect Immun*. 60(7): 2863-2869.
69. Tizard, I. 1995. Serología: detección de anticuerpos y métodos de medida. *Inmunología Veterinaria*. 4ta ed. p 242-266. Ed. Interoamericana McGraw-Hill. México.
70. Vemulapalli, R.; He, Y.; Boyle, S. Sriranganathan, N.; Schurig, G. 2000. *Brucella abortus* RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune response. *Infect. Immun*. 68: 3290-3296.
71. Vemulapalli, R.; He, Y.; Sriranganathan, N.; Boyle, S.; Schurig, G. 2002. *Brucella abortus* RB51: enhancing vaccine efficacy and developing multivalent vaccines. *Veterinary Microbiology*. Vol. 90. 521-532.
72. William, C. 1999. Enfermedades del ganado vacuno lechero. p 623-626. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
73. Wyckoff III, J. 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*. Vol. 90. 395-415
74. Zaitseva, M.; Golding, H.; Manischewitz, J.; Webb, D.; Golding, B. 1996. *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infect Immun*. 64: 3109-3117.
75. Zambrano, A.; Chiriguayo, B.; Villalva, F.; Loo, K. 1991. Eficacia de dosis reducidas en la vacunación de adultos de hatos vacunos infectados con brucelosis. En: *Networking in Brucellosis Research. Report of the United Nations University Brucellosis Research Network*. p 97-99.
76. Zhan, Y.; Kelson, A.; Cheers, C. 1995. Differential activation of *brucella*-reactive CD4⁺ T cells by *brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Infect. Immun*. 63: 969-975.